

Dipeptides, preparation process and us in dosing proteases.

Patent Number: EP0280610
Publication date: 1988-08-31
Inventor(s): QUENTIN GERARD
Applicant(s): SERBIO (FR)
Requested Patent: EP0280610, B1
Application Number: EP19880400304 19880210
Priority Number(s): FR19870002259 19870220
IPC Classification: C07K5/06; C12Q1/36
EC Classification: C07K5/06A1, C07K5/06A2, C07K5/06H2A, C12Q1/37
Equivalents: DE3875359D, DE3875359T, FR2611205
Cited Documents: GB2130221; FR2471411; CH616912; EP0085255; EP0074787; EP0000330;
DD107947

Abstract

As new industrial products, the dipeptides of formula: Q-A1-A2-R1 (I) where Q is an RO-CO-(CR₂R₃)_n-CO residue (where R is H, C₁-C₄ alkyl, optionally substituted phenyl, optionally substituted benzyl or p-CH₃C₆H₄SO₂CH₂, each of R₂ and R₃, which are identical or different, denotes H or C₁-C₄ alkyl and n is an integer with a value of 1 to 5), A₁ is a nonbasic amino acid residue, A₂ is a basic alpha -aminoacid residue, and R₁ is an NHR'₁ amino residue constituting a marker which can be cleaved from A₂ by enzyme hydrolysis (where R'₁ is a support for the means of marking); and their addition salts. These new products can be used as enzyme substrates especially in the field of biological assays.

Data supplied from the esp@cenet database - I2





Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

⑪ Numéro de publication:

0 280 610
A1

⑫

DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

⑬ Numéro de dépôt: 88400304.7

⑭ Int. Cl.⁴: C 07 K 5/06
C 12 Q 1/36

⑯ Date de dépôt: 10.02.88

⑳ Priorité: 20.02.87 FR 8702259

㉑ Demandeur: SERBIO
30, Avenue Flachat
F-92600 Asnières (FR)

㉒ Date de publication de la demande:
31.08.88 Bulletin 88/35

㉓ Inventeur: Quentin, Gérard
145, rue des Renouillers
F-92700 Colombes (FR)

㉔ Etats contractants désignés: DE

㉕ Mandataire: Cliscl, Serge et al
S.A. FEDIT-LORIOT 38 avenue Hoche
F-75008 Paris (FR)

㉖ Dipeptides, procédé de préparation et utilisation dans le dosage de protéases.

㉗ La présente invention vise en tant que produits industriels nouveaux les dipeptides de formule :

Q-A₁-A₂-R₁ (I)

où Q est un reste RO-CO-(CR₂R₃)_n-CO (où R est H, alkyle en C₁-C₄, phényle éventuellement substitué, benzyle éventuellement substitué ou p-CH₃C₆H₄SO₂CH₂, R₂ et R₃ identiques ou différents représentent chacun H ou alkyle en C₁-C₄, et n est un nombre entier valant 1 à 5), A₁ est un reste d'aminoacide non basique, A₂ est un reste d'α-aminoacide basique, et R₁ est un reste amino NHR'₁ constituant un marqueur clivable de A₂ par hydrolyse enzymatique (où R'₁ est un support du moyen de marquage); et leurs sels d'addition.

Ces nouveaux produits sont utiles comme substrats enzymatiques notamment dans le domaine des dosages biologiques.

EP 0 280 610 A1

DescriptionDipeptides, procédé de préparation et utilisation dans le dosage de protéases**DOMAINE DE L'INVENTION**

5 La présente invention concerne, en tant que produits industriels nouveaux, les composés dipeptides de formule I ci-après. Elle concerne également leur procédé de préparation et leur utilisation dans le domaine du dosage de protéases et de peptidases, en particulier en tant que substrats dans le domaine du dosage quantitatif d'enzymes de la classe E.C. 3.4.4 (à présent nouvelle classe "E.C. 3.4.21", selon l'ouvrage "Enzyme Nomenclature", Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam 1973, page 238 et suivantes).

10

ART ANTERIEUR

On sait que les enzymes de la classe sus-visée sont des substances qui scindent les liaisons amides du squelette protéique ou peptidique du côté du groupe carboxyle des restes Arg, Lys, Orn et His. Il s'agit là d'un mécanisme de clivage bien connu de l'homme du métier et qui est amplement exemplifié dans les documents antérieurs cités ci-après.

15 On sait que l'on a déjà proposé dans le passé des substrats spécifiques pour le dosage d'enzymes de ladite classe tels que notamment la thrombine (E.C. 3.4.21.5), la plasmine (E.C. 3.4.21.7), le Facteur Xa (E.C. 3.4.21.6) et la trypsin (E.C. 3.4.31.4), lesdits substrats étant des substances de formule brute :

Xo - Ao - Yo (Ia)
 20 dans laquelle Xo représente un groupe protecteur et le cas échéant un atome d'hydrogène; Yo est un groupe de marquage, notamment un reste radioactif ou un reste capable de conférer, avant ou (mieux) après clivage, une coloration ou une fluorescence; et, Ao est un reste de monoaminoacide ou de polyaminoacide et de préférence un reste tri- ou térapeptidique.

25 Le groupe protecteur Xo est fixé sur l'extrémité N-terminale de la chaîne Ao et représente de façon classique dans la littérature antérieure un groupe acétyle, benzoyle, t-butyloxycarbonyle, benzyloxycarbonyl, succinyle, tosyle ou analogue.

Historiquement, les premiers substrats qui ont été proposés sont ceux dans lesquels Ao représentait un reste de monoaminoacide. Voir à cet effet, l'article de ERLANGER et al., Arch. Biochem. Biophys., 95, 271 (1961) qui décrit les premiers substrats du type

30 CeH₅CO-D,L-Arg-pNA
 Les dérivés de formule Ia où Ao est un reste de monoaminoacide ne se sont pas révélés particulièrement intéressants en tant que substrats d'enzymes, essentiellement par défaut de sélectivité. Néanmoins, on sait que l'acide γ-glutamyl-p-nitroanilide-3-carboxylique a été proposé dans FR-A- 2 208 886 comme substrat chromogène de la γ-glutamyl transpeptidase (E.C. 2.3.2.2), et que, dans FR-A-2 546 163 ont été proposés (i) les PHA-L-Phe-Yo et PHA-L-Tyr-Yo (où PHA désigne un reste polyhydroxyalkyle) pour le dosage de la chymotrypsine (E.C. 3.4.31.1), et (ii) les PHA-L-Arg-Yo et PHA-L-Lys-Yo pour le dosage de la trypsin (E.C.3.4.31.4).

35 Pour pallier les difficultés des substrats monoaminoacides, on sait que l'on a proposé des composés de formule Ia, où Ao représente plus particulièrement un reste tri-ou térapeptidique et Yo un groupe chromogène scindable ou clivable par hydrolyse enzymatique, pour le dosage des enzymes de la classe susvisée. Le nombre de publications concernant les substrats térapeptidiques et surtout tripeptidiques est considérablement supérieur à celui relatif aux substrats de monoaminoacide. Pour information, des tripeptides et des térapeptides sont décrits dans les documents FR-A-2 546 163 précité, FR-A- 2 372 798, EP-A-0 004 256, US-A- 4 508 644, US-A- 4 448 715, FR-A- 2 471 411, FR-A- 2 317 280 et FR-A- 2 459 226.

40 45 On sait notamment de l'exposé de BARBIER présenté lors du 10ème Congrès National des Biologistes des Hôpitaux Généraux tenu à Hyères les 7-9 octobre 1981, que les composés térapeptidiques et surtout tripeptidiques de formule Ia étaient les plus intéressants eu égard à leur spécificité vis-à-vis d'enzymes protéolytiques.

En particulier ont été commercialisés avec succès les tripeptides suivants :
 50 H-D-But-L-CHA-L-Arg-pNA, 2AcOH (cf. exemple 41 de US-A- 4 428 874) en tant que substrat de la plasmine,
 H-D-CHG-L-BUT-L-Arg-pNA, 2AcOH (cf. exemple 71 de US-A- 4 428 874) en tant que substrat de la thrombine ,et
 CH₃SO₂-D-Leu-Gly-L-Arg-pNA, AcOH (selon notamment US-A-4 440 678) en tant que substrat du facteur Xa.

55 60 On sait également que des tri- et térapeptides chromogènes présentant sur l'extrémité N-terminale de la chaîne peptidique un groupe ω-méthoxycarbonylalkylénecarbonyle ou ω-éthoxycarbonylalkylénecarbonyle (où le fragment alkylénecarbonyle comporte 2 à 4 atomes de carbone) ont été proposés dans EP-A-0 128 118 qui d'crit spécifiquement les EtO -CO-CH₂-CO-Lys (ε-Cbo)-Gly-Arg-pNA, AcOH (cf.exemple 14) et MeO-CO-CH₂CH₂-CO-Lys (ε-Cbo)-Gly-Arg-pNA, AcOH (cf.exemple 19). Or il se trouve que, dans la série des tri- et térapeptides, le remplacement d'un atome d'hydrogène de l'extrémité N-terminale NH₂ par un groupe oxycarbonylalkylénecarbonyle entraîne une diminution systématique de l'activité (voir à cet effet les résultats d'essais comparatifs consignés dans le tableau III ci-après).

On sait par ailleurs qu'il existe un très grand nombre de publications ayant trait à l'obtention de composés

dipeptidiques. Pratiquement toutes ces publications présentent les composés dipeptidiques, qu'elles décrivent, en tant qu'intermédiaires de synthèse des tri- et tétrapeptides susvisés.

Ponctuellement, le nombre de documents mentionnant l'utilisation de dipeptides comme substrats est très faible, à savoir :

(i) US-A- 4 217 269 qui décrit des phén oxyacetyl dipeptides chromogènes, en tant que substrats de la thrombine et de la trypsin, notamment les PhO-CH₂CO-L-Pro-L-Arg-pNA, PhO-CH₂CO-L-Pip-L-Arg-pNA, PhO-CH₂CO-L-Aze-L-Lys-pNA, et PhO-CH₂CO-L-Pro-L-Orn-pNA;

(ii) FR-A- 2 471 411 qui propose en tant que substrats, pour le dosage de l'antithrombine III, les dipeptides de formule :

Xo-L-Pro-L-Arg-pNA

où Xo est un groupe α -hydroxyacyle choisi parmi les L- et D- α -hydroxy- β -phénylpropionyle, L- et D- α -hydroxyisocaproyle, et, glucoyle;

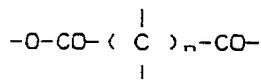
(iii) US-A- 4 448 715 précité qui décrit spécifiquement des tripeptides en tant que substrats de la kallikréine plasmatique et englobe dans sa formule générale des dipeptides de structure :

Xo-L-Phe-L-Arg-Yo

(où Yo est défini comme ci-dessus et Xo représente un groupe cycloalkylcarbonyle dans lequel le reste cycloalkyle comprend de 3 à 6 atomes de carbone) qui ne sont pas exemplifiés; de même des dipeptides sont inclus dans les formules générales proposées par FR-A- 2 546 163 précité et DE-A- 3 108 322, mais ne sont pas spécifiquement exemplifiés dans ces documents.

OBJET DE L'INVENTION

Suivant l'invention on préconise de nouveaux composés dipeptidiques de formule I ci-après qui (i) diffèrent des dipeptides antérieurement connus comme intermédiaires de synthèse ou substrats par la nature du groupe protecteur Q de l'extrémité N-terminale, qui comporte 2 groupes carbonyle et plus précisément une structure linéaire ω -oxycarbonylalkylène carbonyle :



et (ii) sont utiles en tant que substrats vis-à-vis des enzymes de la classe E.C.3.4.21 susvisée et de l'ancienne classe E.C.3.4.4.

On vient de trouver de façon surprenante que ledit groupe protecteur Q, qui a pour formule RO-CO-(CR₂R₃)_n-CO (où R, R₂, R₃ et n sont définis comme indiqué ci-après) et qui est partiellement exemplifié dans EP-A-0 128 118 précité, ne provoque pas dans la série des dipeptides suivant l'invention la baisse d'activité observée pour les séries des tri- et tétrapeptides. Par ailleurs un tel groupe Q n'apparaît pas dans les dipeptides intermédiaires décrits dans EP-A-0 128 118.

Les composés dipeptidiques suivant l'invention sont notamment intéressants en tant que substrats pour le dosage quantitatif de la thrombine, de la plasmine et du Facteur Xa. On a également trouvé qu'ils sont en outre particulièrement intéressants eu égard à leur spécificité vis-à-vis de la Protéine C.

Les nouveaux dérivés dipeptidiques suivant l'invention sont caractérisés en ce qu'ils sont choisis parmi l'ensemble comprenant :

(I) les composés de formule :

Q-A₁-A₂-R₁ (I)

dans laquelle :

Q est une reste RO-CO-(CR₂R₃)_n-CO où

R représente l'atome d'hydrogène, un groupe alkyle en C₁-C₄, un groupe phényle éventuellement substitué par un ou plusieurs groupes notamment CH₃, OCH₃ et alkylénedioxy, un groupe benzyle éventuellement substitué par un ou plusieurs groupes, notamment CH₃, OCH₃ et alkylénedioxy, ou, un groupe tosylméthoxy;

R₂ et R₃, identiques ou différents, représentent chacun l'atome d'hydrogène ou un groupe alkyle en C₁-C₄; n est un nombre entier ayant pour valeur 1 à 5;

R₁ qui est un reste amino de formule NH-R'₁, constitue un marqueur clivable du groupe A₂ par hydrolyse enzymatique, le groupe R'₁ intervenant comme support du moyen de marquage;

A₁ est un reste de monoaminoacide choisi parmi l'ensemble comprenant les restes d'aminoacides non-basiques;

A₂ est un reste de monoaminoacides choisi parmi l'ensemble comprenant les restes d' α -aminoacides basiques; et

(ii) leurs sels d'addition.

ABREVIATIONS

Dans la présente description on a utilisé les abréviations suivantes par commodité :

-pour les restes d'aminoacide :

Ahx = ϵ -aminohexanoyle
 ACC = 1-amino-cyclohexane-1-carbonyle
 Aib = 2-aminoisobutyryle (ou 2- méthylalanyle)
 5 Ala = α -alanyle
 β -Ala = β -alanyle
 Arg = arginyle
 Asn = asparaginyle
 Asp = α -aspartyle
 10 β -Asp = β -aspartyle
 ATC = thiazolidine-4-carbonyle (ou thioprolyle)
 Aze = azétidine-2-carbonyle
 But = 2-aminobutyryle (ou α -amino-n-butyryle)
 4-But = 4-aminobutyryle (ou γ -amino-n-butyryle)
 15 CHA = 3-cyclohexylalanyle
 CHG = α -cyclohexylglycyle
 CHT = 3-(4-hydroxycyclohexyl)alanyle
 Cle = cyclocleucyle (ou 1-amino-cyclopropane-1-carbonyle)
 Cys = cystéyle
 20 Dab = 2,4-diaminobutyryle
 π -Dab = pyrodiaminobutyryle
 Gln = glutamyle
 Glu = glutaminyle
 γ -Glu = γ -glutaminyle
 25 Gly = glycyle
 His = histidyle
 4-Hyp = 4-hydroxyprolyle (ou 4-hydroxy-2-pyrrolidinecarbonyle)
 3-Hyp = 3-hydroxyprolyle (ou 3-hydroxy-2-pyrrolidinecarbonyle)
 Ile = isoleucyle
 30 Leu = leucyle
 Lys = lysyle
 Met = méthionyle
 Nleu = norleucyle
 NVal = norvalyle
 35 Orn = ornithinyle
 Phe = phénylalanyle
 Phg = phénylglycyle
 Pip = pipécolinoyle
 Pro = prolyle
 40 Pyr = pyroglutaminyle (ou 2-pyrrolidone-5-carbonyle)
 Sar = sarcosyle
 Ser = séryle
 Thr = thréonyle
 Tyr = tyrosyle
 45 Val = valyle

- pour les autres abréviations :

Ac = acétyle
 AcOH = acide acétique
 50 Adoc = adamantlyloxycarbonyle
 Aoc = t-amyoxy carbonyle
 Boc = t-butyloxycarbonyle
 Bz = benzoyle
 Bzl = benzyle
 55 Cbo = carbobenzoxy
 CCM = chromatographie sur couche mince
 o-Cl-pNA = o-chloro-p-nitroanilide
 DCCI = dicyclohexylcarbodiimide
 DCHU = dicyclohexylurée
 60 DMF = diméthylformamide
 Et = éthyle
 Et₃N = triéthylamine
 Foc = furfuryloxycarbonyle
 HMPT = N,N,N',N'',N"- hexaméthylphosphorotriamide
 65 HOBT = 1-hydroxybenzotriazole

HPLC = chromatographie liquide de haute performance	
H-TFA = acide trifluoroacétique	
Iboc = isobornyloxycarbonyle	
Me = méthyle	
MM = $\text{CH}_3\text{O}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CO}$ - (i.e. méthyoxy malonyl, groupe protecteur suivant l'invention).	5
nkat = nanokatal (1 nkat est l'activité enzymatique d'un enzyme qui hydrolyse 1 nanomole de son substrat par seconde dans les conditions standard)	
OD = densité optique	
pNA = p-nitroanilide	
Ph = phényle	10
RT = température ambiante (15-20 °C)	
TEA = triéthanolamine	
Tos = p-toluenesulfonyl (ou tosyle)	
UNIH = unité enzymatique standardisée de l'"US National Institute of Health"	
Z = benzyloxycarbonyle	15
Z (p-Cl) = p-chlorobenzyloxycarbonyle	
Z(p-OMe) = p-méthoxybenzyloxycarbonyle	

DESCRIPTION DETAILLEE DE L'INVENTION

Parmi les groupes alkyle en C₁-C₄ inclus dans les définitions de R, R₂ et R₃, qui conviennent selon l'invention, on peut mentionner notamment les groupes CH₃, CH₂CH₃, CH₂CH₂CH₃, CH(CH₃)₂, C(CH₃)₃ et CH(CH₃)CH₂CH₃.

Parmi les groupes benzyles substitués qui entrent dans la définition de R on peut notamment citer les groupes 3-méthylbenzyle, 3,5-diméthylbenzyle, 4-méthylbenzyle, 4-méthoxybenzyle, 3,4-diméthoxybenzyle, 2,4,6-triméthoxybenzyle et 3,4-méthylènedioxybenzyle.

Parmi les groupes phényle substitués, qui entrent dans la définition de R, on peut notamment mentionner les groupes o-, m- et p-tolyle, xylyle, 2-, 3- et 4-méthoxyphényle, 3,5-diméthoxyphényle, 3,4-diméthoxyphényle, 2,4-diméthoxyphényle, 3,4,5-triméthoxyphényle, 2,4,6-triméthoxyphényle, 3,4-méthylènedioxyphényle, 3-méthoxy-4-méthylphényle et 4- méthoxy-3-méthylphényle. De façon avantageuse, on préfère surtout suivant l'invention que R = CH₃ et que R₂ = R₃ = H

A₁ est un reste de monoaminoacide non basique. Il provient d'un aminoacide naturel ou synthétique ayant un pH inférieur ou égal à 7 ou d'un aminoacide ayant un pH supérieur à 7 mais convenablement substitué pour bloquer essentiellement son caractère basique et atteindre un pH inférieur ou égal à 7.

A₁ englobe donc:

1°) les restes d'aminoacides naturels ou synthétiques qui comprennent une seule fonction acide et une seule fonction basique,

2°) les restes d'aminoacides naturels ou synthétiques qui comprennent une seule fonction basique et plus d'une fonction acide et dans lesquels chaque fonction acide latérale (n'entrant pas ou n'intervenant pas dans la liaison peptidique) est susceptible d'être bloqué notamment sous forme amide ou ester, et

3°) les restes d'aminoacides naturels ou synthétiques qui comprennent une seule fonction acide et plus d'une fonction basique et dans lesquels chaque fonction basique latérale est convenablement substituée pour bloquer et supprimer essentiellement son caractère basique.

Bien entendu les restes d'aminoacides sus-visés, qui sont notamment énumérés dans le chapitre abréviation ci-dessus, peuvent comporter des groupes hydroxyle (OH) ou thiol (SH) latéraux qui sont susceptibles d'être bloqués, le cas échéant, par un groupe protecteur éther ou ester.

Conviennent en particulier pour A₁, les restes provenant d'aminoacides:

- naturels non-basiques dits "neutres" tels que notamment Ala, β -Ala, Cys, Gin, Gly, 4-Hyp, 3-Hyp, Leu, Met, MLeu, NVal, Phe, Pro, Sar, Ser, Thy, Tyr, Val, où le groupe OH latéral des restes 4-Hyp, 3-Hyp, Ser, Thr, Tyr est protégé ou non par un groupe protecteur éther ou ester, et où le groupe SH latéral du reste Cys est protégé ou non par un groupe protecteur thioéther ou thioester;

- naturels acides tels que notamment Asp, β -Asp, Glu, γ -Glu, dans lesquels la fonction acide latérale est libre ou bloquée sous forme ester, notamment sous forme d'ester benzylque ou t-butylque;

- naturels initialement basiques dans lesquels la ou les fonctions basiques latérales n'entrant pas dans la liaison peptidique sont bloquées par un groupe convenable éliminant pratiquement le caractère basique tel que Boc, Cbo etc, lesdits restes d'aminoacide étant notamment les restes Arg, Lys, His, et Orn convenablement bloqués notamment par un groupe Cbo;

- synthétiques non-basiques dits "neutres" tels que notamment ACC, Ahx, Alb, ATC, Aze, But, 4-But, CHA, CHG, CHT (où le groupe OH latéral est protégé le cas échéant sous forme éther ou ester), Cle, π -Dab, Phg, Pip, Pyr;

- synthétiques initialement basiques dans lesquels chaque fonction basique latérale est protégée par un groupe convenable éliminant substantiellement le caractère basique, notamment le reste Dab où la fonction basique latérale est bloquée par un groupe tel qu Cbo.

Parmi les restes d'aminoacides synthétiques qui conviennent également, on peut notamment mentionner (I) les restes d'aminoacides cycloaliphatiques où le group amino et le groupe carboxy sont situés sur le même atome de carbone cyclique (tels que Cle susvisé) ou sur deux atomes de carbone cycliques différents et (II)

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

les restes d'acides aminés aromatiques tels que notamment les restes o-, m- et p-aminobenzoyle, et, les restes d'acides aminés aralkyliques tels que notamment les p-aminobenzylcarbonyle, m-aminobenzylcarbonyle.

De façon avantageuse le reste A₁ selon l'invention sera un reste d'α-aminoacide tel que ACC, Aib, Ala, ATC, Aze, But, CHA, CHG, CHT, Cle, Gly, 4-Hyp, 3-Hyp, Ile, Leu, Met, NLeu, NVal, Phe, Pip, Pro, Sar, Ser, Thr, Tyr, Val, un reste β-Ala, ou un reste CHT, 4-Hyp, 3-Hyp, Ser, Thr, Tyr dans lequel le groupe latéral OH est protégé par un groupe éther ou ester.

Le reste A₁ comprend donc des restes d'acides aminés tel que Aib, Cle, Gly, Sar et 4-But dépourvus d'atome de carbone asymétrique, et des restes d'acides aminés présentant un atome de carbone asymétrique.

Lorsque l'aminoacide présente un atome de carbone asymétrique, le reste A₁ est, de préférence, de configuration L car les dipeptides de formule I dans lesquels A₁ est un reste de configuration D sont en général inactifs ou peu actifs en tant que substrats.

Le groupe A₁, selon l'invention sera de préférence un groupe Aib, L-Ala, β-Ala, L-ATC, L-Aze, L-But, L-CHA, L-CHG, L-CHT, Cle, Gly, L-4-Hyp, L-3-Hyp, L-Ile, L-Leu, L-NLeu, L-NVal, L-Phe, L-Pip, L-Pro, Sar, L-Ser, L-Thr, L-Tyr, L-Val ou un reste L-CHT, L-4-Hyp, L-3-Hyp, L-Ser, L-Thr ou L-Tyr dans lequel le groupe OH latéral est protégé par un groupe éther ou ester.

A₂ est le rest d'un α- acide aminé basique. Il provient d'un monoacide ayant un pH supérieur à 7, c'est-à-dire comportant une fonction acide COOH et, en plus de la fonction basique en α, au moins une fonction basique latérale. Dans A₂ ladite fonction basique latérale n'est pas bloquée. Parmi les restes d'α-acides aminés qui conviennent, on peut mentionner notamment les restes Dab, L-Arg, L-Lys, L-His et L-Orn. Les restes préférés sont des restes d'α-L-acides aminés, notamment L-Arg, L-Lys, L-His et L-Orn, le reste le plus intéressant selon l'invention étant L-Arg.

Le groupe marqueur aminé R₁ est bien connu dans la technique des dosages biologiques et microbiologiques, voir à cet effet le document US-A- 4 448 715 précité. Il peut notamment être choisi parmi les groupes NH-R'₁ qui (i) induisent une modification de coloration, (ii) induisent une modification de fluorescence ou (iii) comportent au moins un élément radioactif. Convient au but de l'invention tout groupe amino NH-R'₁ donnant pendant ou après la réaction enzymatique un signal susceptible d'être amplifié pour être détecté (par exemple par mesure de la densité optique sous un longueur d'onde donnée, ou encore par mesure de la radioactivité).

Parmi les groupes fluorescents entrant dans la définition de R₁ on peut notamment citer les 4-méthylcoumaryl-7-amino, 4-trifluorométhylcoumaryl-7-amino et analogues.

Le groupe R₁ peut également représenter un groupe comportant un élément radioactif, par exemple un groupe anilino ou benzylamino marqué par un radioisotope ¹⁴C ou ³H.

Le groupe R₁ que l'on préfère suivant l'invention est un groupe chromogène, de façon typique un groupe nitrophényle (dans lequel le reste phényle est susceptible d'être substitué par un groupe COOH, F, Cl, Br, CH₃, OCH₃, CN, CF₃, et/ou SO₃H), un groupe naphtyle (dans lequel le reste naphtyle est susceptible d'être substitué par un groupe OCH₃, COOH, SO₃H ou CH₃), un groupe pyrimidinyle, benzimidazoyle, triazinyle, indazolyle, prényle, coumaryle, quinolyle etc.

De façon avantageuse, le groupe R₁ représentera un reste aminé chromogène ou fluorescent. Parmi les groupes aminés chromogènes, qui conviennent suivant l'invention, on peut notamment citer les p-nitroanilino (en abrégé pNA), 2-carboxy-4-nitroanilino et 3-carboxy-4-nitroanilino, 2-halogéno-4-nitroanilino et 3-halogéno-4-nitroanilino (où l'halogène est F, Cl ou Br), 2-méthoxy-5-méthyl-4-nitroanilino, 2-hydroxysulfonyl-4-nitroanilino, 4-trifluorométhyl-2-nitroanilino, 4-trifluorométhyl-3-nitroanilino, 4-cyano-2-nitroanilino, 2-naphtylamino, 4-hydroxysulfonyl-1-naphtylamino, quinolylamino, nitroquinolylamino, 2-pyrimidinylamino et analogues.

Le groupe R₁ que l'on préfère suivant l'invention est un groupe chromogène, à savoir pNA, qui convient d'une manière générale à la détermination quantitative des enzymes protéolytiques susvisés et est particulièrement adapté à la détermination de la Protéine C et de la plasmine.

Les sels d'addition suivant l'invention sont essentiellement des sels d'addition d'acide obtenus par réaction d'un composé de formule I avec un acide minéral ou organique.

Le meilleur mode de mise en oeuvre de l'invention consiste à utiliser comme substrat un composé dipeptide, dans lequel R est CH₃, R₂ et R₃ sont H, et, n vaut 1, et répondant à la formule :

CH₃O-CO-CH₂-CO-A₁-Arg-pNA (II)
où A₁ est choisi parmi les restes Ahx, L-Ala, β-Ala, L-ATC, L-Aze, L-But, L-CHA, L-CHG, L-CHT, Gly, L-4-Hyp, L-3-Hyp, L-Ile, L-Leu, L-NLeu, L-NVal, L-Phe, L-Pip, L-Pro, Sar, L-Ser, L-Thr, L-Tyr et L-Val et les restes L-CHT, L-4-Hyp, L-3-Hyp, L-Ser, L-Thr et L-Tyr dans lesquels le groupe OH latéral est protégé sous forme éther ou ester.

Les composés de formule II ont l'avantage de présenter une grande affinité pour l'eau à la différence des dérivés peptidiques antérieurement connus qui sont peut solubles ou peu dispersables dans l'eau. En raison de la faible affinité pour l'eau des peptides antérieurement connus, il est quelquefois nécessaire de leur adjoindre un solvant organique afin de pouvoir les utiliser. Les systèmes comprenant des solvants mixtes (notamment du type au-solvant organique) ne sont guère compatibles d'une manière générale avec les milieux biologiques : ils entraînent soit une diminution de l'activité du substrat, soit encore dans certains cas une détérioration de l'enzyme que l'on veut doser. De plus, la faible affinité pour l'eau de ces substrats entraîne une diminution de la sensibilité des méthodes de dosage des enzymes. L'utilisation des composés de formule II permet de pallier avantageusement les inconvénients sus-énoncés.

De façon non limitative on a consigné dans le tableau I ci-après un certain nombre de composés dipeptides

0 280 610

suivant l'invention notés "Ex" avec des peptides de référence notés "A1-A4", et, des peptides de comparaison notés "B1-B4" comportant le groupe protecteur terminal CH₃O-CO-CH₂-CO selon l'invention et "C1-C4" sans ledit groupe protecteur.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

0 280 610

TABLEAU I

Q-A₁-A₂-pNA, xHX

PRODUIT	N° DE CODE	Q	A ₁	A ₂	xHX
EX 1	SQ 41	MM	L-Pro	L-Arg	H-TFA
EX 2	SQ 57	MM	L-Val	L-Arg	H-TFA
EX 3	SQ 58	MM	L-Ala	L-Arg	H-TFA
EX 4	SQ 59	MM	L-Phe	L-Arg	H-TFA
EX 5	SQ 60	MM	L-Ser (Bzl)	L-Arg	H-TFA
EX 6	SQ 61	MM	β -Ala	L-Arg	H-TFA
EX 7	SQ 62	MM	L-Leu	L-Arg	H-TFA
EX 8	SQ 63	MM	L-NLeu	L-Arg	H-TFA
EX 9	SQ 64	MM	L-NVal	L-Arg	H-TFA
EX 10	SQ 65	MM	L-4-Hyp	L-Arg	H-TFA
EX 11	SQ 66	MM	Gly	L-Arg	H-TFA
EX 12	SQ 67	MM	L-ATC	L-Arg	H-TFA
EX 13	SQ 68	MM	Aib	L-Arg	H-TFA
EX 14	SQ 69	MM	L-But	L-Arg	H-TFA
EX 15	SQ 70	MM	L-Thr(Bzl)	L-Arg	H-TFA
EX 16	SQ 73	MM	L-Ahx	L-Arg	H-TFA
EX 17	-	MM	L-CHA	L-Lys	H-TFA
EX 18	-	MM	L-Lys(ϵ -Cbo)	L-Arg	AcOH

TABLEAU I (fin)

PRODUIT	N° DE CODE	Q	A ₁	A ₂	xHX	
EX 19	-	(1)	L-Val	L-Arg	AcOH	10
EX 20	-	(2)	L-Leu	L-Orn	AcOH	
EX 21	-	(2)	L-CHG	L-Arg	AcOH	15
EX 22	-	(1)	L-CHA	L-Arg	AcOH	
EX 23	-	MM	Ahx	L-Lys	AcOH	
EX 24	-	MM	L-Pro	L-His	AcOH	20
A ₁	34.47	H	D-CHG-L-But	L-Arg	2AcOH	25
A ₂	31.39	CH ₃ SO ₂	D-Leu-Gly	L-Arg	AcOH	
A ₃	30.41	H	D-But-L-CHA	L-Arg	2AcOH	
A ₄	65.25	H	D-Lys(εCba)-	L-Arg	2AcOH	30
			L-Pro			
B ₁	SQ 72	MM	Gly-L-Pro	L-Arg	H-TFA	35
C ₁	-	H	Gly-L-Pro	L-Arg	2 H-TFA	
B ₂	SQ 71	MM	Gly-L-Pip	L-Arg	H-TFA	40
C ₂	-	H	Gly-L-Pip	L-Arg	2 H-TFA	
B ₃	SQ 56	MM	D-Pro-L-Pro	L-Arg	H-TFA	45
C ₃	55.10	H	D-Pro-L-Pro	L-Arg	2 H-TFA	
B ₄	SQ 52	MM	D-NLeu-L-CHA	L-Arg	H-TFA	
C ₄	33 08	H	D-NLeu-L-CHA	L-Arg	2 H-TFA	50

Notes

(1) pCH₃C₆H₄SO₂CH₂O-CO-CH₂-CO

(2) pMeOC₆H₄O-CO-CH₂-CO;

Les composés dipeptides de formules I et II ci-dessus peuvent être préparés selon une méthode connue en soi par application de mécanismes réactionnels classiques. Suivant l'invention on préconise un procédé de

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

préparation qui est caractérisé en ce qu'il comprend :

1°) la réaction d'un α -aminoacide N-protégé par un groupe protecteur temporaire approprié Z_1 de formule :

Z_1-A_2-OH (III)

où A_2 est défini comme ci-dessus, avec un isocyanate, correspondant au groupe marquer R_1 , de formule :

$O=C=N-R'_1$ (IV)

pour obtenir un composé de formule :

$Z_1-A_2-R_1$ (V)

2°) la soumission du composé V ainsi obtenu à une réaction d'acidolyse au moyen d'un mélange HBr/AcOH pour éliminer le groupe protecteur Z_1 et obtenir le dérivé de formule :

$H-A_2-R_1$ (VI)

3°) la réaction du dérivé VI ainsi obtenu avec un aminoacide N-protégé de formule :

Z_2-A_1-OH (VII)

où A_1 est défini comme indiqué ci-dessus et Z_2 est un groupe protecteur temporaire, pour obtenir par condensation un dipeptide protégé de formule :

$Z_2-A_1-A_2-R_1$ (VIII)

4°) la soumission dudit dipeptide N-protégé de formule VIII ainsi obtenu à une réaction d'acidolyse au moyen de l'acide trifluoroacétique pour éliminer le groupe protecteur Z_2 et donner un dipeptide de formule :

$H-A_1-A_2-R_1$ (IX)

et,

5°) la réaction du dipeptide de formule IX ainsi obtenu avec un composé de formule :

$R-O-CO-CR_2R_3-CO-T$ (X)

où R_1 R_2 et R_3 sont définis comme indiqué ci-dessus et T représente OH, F, Cl ou Br (l'atome d'halogène préféré étant le chlore) pour obtenir le composé de formule I attendu.

Le groupe protecteur temporaire Z_1 qui intervient au stade 1° est ici un groupe protecteur classique bien connu de l'homme de l'art, par exemple Boc, Aoc, Adoc, Foc, Iboc, Z, Z(p-Cl), Z(p-OMe) ou analogue. Le groupe protecteur temporaire Z_2 est un groupe protecteur classique de l'extrémité N-terminale, ici ce group est identique ou analogue à Z_1 .

Le stade 5° comprend la réaction du dipeptide de formule IX avec un halogénure d'acide:

$R-O-CO-CR_2R_3-CO-Hal$ (XI)

où Hal représente un halogène F, Cl, ou Br, ou avec un acide:

$R-O-CO-CR_2R_3-CO-OH$ (XII)

De façon avantageuse la réaction IX + XI → I est mise en oeuvre dans un solvant inerte tel que notamment le DMF en présence d'une base en excès agissant comme co-solvant et accepteur de protons, notamment Et₃N, avec un rapport molaire IX/XI inférieur ou égal à 1/2.

De façon avantageuse la réaction IX + XII est effectuée dans un solvant inerte tel que notamment le DMF en présence d'une base en excès intervenant comme co-solvant et accepteur de protons, notamment Et₃N, de HOBT et de DCCI, à une température voisine de 0°C pendant au moins 1 heure puis à RT pendant au moins 24 heures, le rapport molaire IX/XII étant compris entre 1/1 et 1/1,5.

De façon préférée, on utilisera dans la réaction IX + XI → I un rapport molaire IX/Et₃N inférieur ou égal à 1/2,7 et dans la réaction IX + XII → I un rapport molaire IX/Et₃N de l'ordre 1/1,1, un rapport molaire IX/HOBT de l'ordre de 1/2 et un rapport molaire IX/DCCI de l'ordre de 1/1,18 à 1/1,20. Dans cette dernière réaction le couplage se fait par une activation *in situ* de la fonction acide en présence de DCCI et HOBY, HOBT étant un agent de couplage non racémisant.

D'autres avantages et caractéristiques de l'invention seront mieux compris à la lecture qui va suivre d'exemples de préparation et d'essais comparatifs, l'ensemble de ces éléments n'étant pas limitatif mais donné à titre d'illustration.

50 PREPARATION I

Obtention de MM-L-4-Hyp-L-Arg-pNA, H-TFA (Exemple 10 : No de code : SQ 65)

55 a) Z-L-Arg-pNA, HCl

On dissout 13 g (41 mmoles) de Z-L-Arg-OH, HCl (préalablement séché sur P₂O₅) dans 100 ml de HMPT anhydre à RT. On additionne à RT 5,7 ml de Et₃N et ensuite graduellement 82 mmoles d'Isocyanate de p-nitrophényle (2 eq). On laisse le mélange réactionnel sous agitation à RT pendant 24 h. On concentre ensuite le milieu réactionnel par distillation de HMPT sous pression réduite. Le résidu d'évaporation est pris plusieurs fois avec une solution aqueuse de AcOH à 30 % p/v. La solution acétique est purifiée par HPLC préparative sur un système "PROTEIN-PAK" (colonnes échangeuse d'ions "SP 5PW" de dimensions : 15cm x 2,15cm; commercialisée par la société dite MILLIPORE WATERS). On obtient le produit att. pur avec un rendement de 45% :

$[\alpha]^{20}D = -10,9^\circ$ (c = 1% dans MeOH)

65 Ce produit ainsi obtenu est homogène en CCM :

Rf. = 0,6 avec comme éluant : CHCl₃-MeOH-AcOH (5/3/1) v/v; et
 Rf. = 0,5 avec comme éluant : CHCl₃-MeOH-AcOH-H₂O (60/45/24/6) v/v.

Les fractions obtenues après chromatographie préparative sont contrôlées en HPLC sur une colonne de même nature (de dimension : 7,5cm x 0,75 cm), la phase mobile utilisée étant un gradient de 2 tampons allant en 25 minutes de 100 % de tampon A (Tris 20 mM à pH 8,5 et acétonitrile 10 %) à 100 % de tampon B (Tris 20 mM à pH 8,5 + NaCl 1 M et acétonitrile 10 %) à un débit de 1 ml/min, la détection étant réalisée à 254 nm et à 20°C.

b) H-Arg-pNA, 2HBr

A 10 g (23 mmoles) de Z-Arg-pNA, HCl ainsi obtenu on ajoute successivement 20 ml d'anisole, 80 ml de AcOH glacial et 100 ml d'une solution de HBr à 45 % dans AcOH glacial. On laisse le milieu réactionnel à RT pendant ne heure et suit l'évolution de la réaction par CCM. Dès qu'elle est achevée, on transvase le milieu réactionnel dans un litre d'éther et agite vigoureusement pendant quelques minutes. Après décantation, l'écoulement est aspiré au moyen d'un tube plongeant muni d'un filtre en verre fritté. L'opération de lavage dans l'éther est répétée plusieurs fois (au moins trois fois) et le produit obtenu est séché. On obtient 9,5 g (rendement : 97 %) de H-Arg-pNA, 2HBr sous forme de poudre $[\alpha]^{20^\circ\text{C}} 546 \text{ nm} = +55,1^\circ$ (c = 1% dans MeOH).

Ce produit est homogène en CCM [éluant : CHCl₃/MeOH/AcOH (5/3/1) v/v]; Rf. = 0,4.

L'analyse par HPLC sur "PROTEIN PAK" "SP 5PW" (dimensions : 7,5 cm x 0,75 cm) avec le gradient sus-décrété de tampons A et B donne un temps de rétention de 34,6 minutes.

c) Boc-L-4-Hyp-L-Arg-pNA, HBr

On introduit sous agitation 10 g (1 eq) de H-L-Arg-pNA, 2HBr et 5,0575 g (1 eq) de Boc-L-4-Hyp-OH dans un ballon contenant 66 ml de DMF et refroidi au moyen d'un bain de glace. Lorsque la température d'équilibre est atteinte, on ajoute 3,055 ml (1 eq) de Et₃N, 6,785 g (1,5 eq) de DCCI et 6,695 g (2eq) de HOBT. On laisse réagir le milieu réactionnel pendant 24 heures. On contrôle l'achèvement de la réaction par CCM puis ajoute la réaction terminée 1,0 ml de AcOH glacial et agite pendant 0,25 h. Par filtration de la DCHU formée et évaporation du filtrat sous pression réduite, on obtient par précipitation dans l'éther 6,823 g du produit attendu homogène par CCM et HPLC.

Analyse

1°) CCM sur couche de silice

- CCM (A) avec éluant : mélange CHCl₃/MeOH/AcOH (50/30/10) v/v

Rf = 0,75

- CCM (B) avec éluant : mélange n-butanol/AcOH/eau (3/1/1) v/v

Rf = 0,60

2°) HPLC sur "PROTEIN PAK" (avec gradient de deux tampons comme indiqué ci-dessus : les tampons A et B précités), temps de rétention 16,6 minutes.

3°) Pouvoir rotatoire

$[\alpha]^{20^\circ\text{C}} 546 \text{ nm} = -45,50^\circ$ (c = 1% dans MeOH)

d) H-L-4-Hyp-L-Arg-pNA, 2H-TFA

Dans un ballon muni d'une garde de CaCl₂, on introduit 6,823 g (1 eq) de Boc-L-4-Hyp-L-Arg-pNA, HBr, 32,6 ml (3,7 eq) de H-TFA et 32,6 ml de dichlorométhane. La durée de réaction est d'environ 1 h; 30 min après le début de la réaction, on contrôle son évolution par CCM (A) et CCM (B) comme indiqué ci-dessus au stade c). Lorsque la réaction est achevée, on évapore H-TFA sous pression réduite, puis par précipitation dans l'éther, on obtient 7,382 g du produit attendu.

Analyse

1°) CCM sur silice

CCM (A) : Rf = 0,55

CCM (B) : Rf = 0,42

2°) HPLC (avec gradient de deux tampons : tampon A comme au stade b) et tampon C (Tris 20mM à pH 8,5 + acétonitrile 10 % + NaCl 1M)), temps de rétention : 18,4 minutes.

3°) $[\alpha]^{20^\circ\text{C}} 546 \text{ nm} = -21,4^\circ$ (c = 1% dans MeOH).

e) MM-L-4-Hyp-L-Arg-pNA, H-TFA

On introduit sous agitation 7,382 g (12 mmoles) de H-L-4-Hyp-L-Arg-pNA, 2H-TFA avec 35 ml de DMF dans un ballon de 50 ml refroidi au bain de glace et maintient l'agitation. Lorsque la température d'équilibre est atteinte, on ajoute 4,4 ml (31,4 mmoles; soit 2,7 eq) de Et₃N puis 2,5 ml (24 mmoles) de chlorure de méthoxy malonylique (MMCI). Après 6 h on contrôle l'achèvement de la réaction par CCM. Si la réaction n'est pas terminée on ajoute 1,5 eq (2,5 ml) de Et₃N puis 5 minutes après 1 eq (1,25 ml) de MMCI. Au bout de 24 h on contrôle l'achèvement de la réaction par CCM. La réaction étant achevée on évapore à sec sous pression réduite et par précipitation dans l'éther on obtient 7,219 g du produit attendu. Ce produit brut est purifié par HPLC préparative et contrôlé par HPLC analytique. Seules sont réunies les fractions homogènes répondant

favorablement à une hydrolyse enzymatique et conduisant à une libération de pNa. Les fractions ainsi retenues que l'on obtient sont concentrées sous pression réduite puis lyophilisées.

Analysé

5 1°) CCM sur silice
 CCM (A) : Rf = 0,85
 CCM (B) : Rf = 0,52
 2°) HPLC (avec un gradient de deux tampons: tampons A et B du stade b)), temps de rétention : 16 minutes.
10 3°) $[\alpha]_{D}^{20^\circ} c 546 \text{ nm} = -30,4^\circ$ (c = 1 % dans MeOH)

PREPARATION II

En procédant suivant le procédé de la préparation I, mais en remplaçant l'isocyanate de p-nitrophényle par l'isocyanate de σ -chloro-p-nitrophényle, on obtient le MM-L-4-Hyp-L-Arg- σ -Cl-pNA, H-TFA.

15 **PREPARATION III**
 Obtention de MM-L-Pro-L-Arg-pNA, H-TFA (Exemple 1; n° de code : SQ 41)
 Dans un ballon on dissout successivement 317 mg (2,68 mmoles) d'acide monométhoxy malonique, 1,66 g (2,68 mmoles) de H-L-Pro-L-Arg-pNA, 2H-TFA, 800 mg (5,36 mmoles) de HOBT et 413 μ l (2,95 mmoles) et 20 Et₃N dans 15 ml de DMF. Le mélange est refroidi dans de la glace et mis sous agitation. On ajoute 660 mg (3,2 mmoles) de DCCI et maintient l'agitation pendant une heure à 0° C et 24 heures à RT. On suit l'évolution de la réaction par CCM. Après achèvement de la réaction on filtre pour écarter la DCHU formée et évapore le solvant du filtrat sous pression réduite. Le résidu d'évaporation ainsi obtenu est précipité dans l'éther et purifié par HPLC préparative sur dispositif "PROTEIN PAK" SP 5 PW (de dimensions 15 cm x 2,15 cm). Les fractions 25 receuillies sont homogènes en CCM et HPLC.

Analysé

30 1°) CCM sur silice
 CCM (A) : Rf = 0,64
 CCM (B) : Rf = 0,60
 2°) HPLC (gradient de deux tampons : tampons A et B de la préparation Ia)), temps de rétention : 16,4 minutes
 3°) $[\alpha]_{D}^{20^\circ} c 546 \text{ nm} = -65,9^\circ$ (c = 1% dans MeOH)
 On a consigné ci-après dans le tableau II les caractéristiques des produits suivant l'invention.

35

40

45

50

55

60

65

TABLEAU II

PRODUIT	$[\alpha]_{20^\circ C}^{20^\circ C}$ 546 nm (conc. / MeOH)	Rf		HPLC	
		CCM(A)	CCM(B)	(a)	(b)
EX 1	-65,9° (1%)	0,64	0,60	16,4	A-B
EX 2	-33° (1%)	0,98	0,64	14	A-C
EX 3	-25° (1%)	0,96	0,56	13	A-C
EX 4	-9,6° (1%)	0,94	0,69	34,4	A-B
EX 5	-16,9° (1%)	0,97	0,75	37,5	A-B
EX 6	-18,7° (1%)	0,79	0,58	26,2	A-B
EX 7	-22° (1%)	1,0	0,66	22	A-B
EX 8	-46,7° (1%)	0,99	0,64	26,6	A-B
EX 9	+21,3° (1%)	0,975	0,63	19,8	A-B
EX 10	-30,4° (1%)	0,85	0,52	16	A-B
EX 11	-13,5° (1%)	0,8	0,5	19,9	A-B
EX 12	-40,4° (1%)	0,92	0,53	23,7	A-B
EX 13	+1,08° (1%)	0,9	0,56	23,6	A-B
EX 14	-15,8° (1%)	0,925	0,59	17,1	A-B
EX 15	-13,0° (1%)	0,90	0,77	33,8	A-B

Notes:

(a) temps de rétention en minutes

(b) gradient de deux tampons allant en 25 minutes de 100% de A à 100 % de B ou C, puis restant pendant 20 minutes à 100% de B ou C; lecture à 254 nm, à 20° C (pour tampons A et B, voir préparation Ia et pour tampon C voir préparation Id)

ACTIVITE DES SUBSTRATS

L'activité des dipeptides suivant l'invention et des tripeptides consignés dans le tableau I a été étudiée sur la thrombine humaine, la plasmine humaine, le Facteur Xa humaine et la Protéine C bovine, les tripeptides A1-A4 étant les substrats de référence du commerce. La libération du marqueur HR₁ (i.e. amine H₂HR'₁), qui est objectivée par la variation de OD pendant l'hydrolyse enzymatique des substrats, sert d'outil de comparaison.

La lecture de OD est en général effectuée à 300-470 nm, et plus précisément à 405 nm quand R₁ est pNA, pendant environ 5 minutes.

Les essais ont été réalisés sur appareil GILFORD 203 S pour automatiser la lecture des échantillons et standardiser leur traitement.

10

Enzymes

On prépare des solutions dans du sérum physiologique renfermant chacune un enzyme :

thrombine humaine 3 UNIH/ml

Facteur Xa humain 3,7 nkat/ml

15

plasmine humaine 2,3 nkat/ml

protéine C bovine activée 10µg/ml

Substrats

On dissout chaque peptide à tester dans l'eau à une concentration de 10 mg/ml.

20

Mesures

400 µl d'enzyme dilué au 1/2 dans du tampon TEA (pH 8,4) sont ajoutés à 200 µl de chacun des différents peptides à tester. On détermine les vitesses d'hydrolyse desdits substrats en suivant l'évolution de la libération de pNA. Cette évolution peut être suivie par la lecture de la variation de OD par unité de temps (ΔOD/minute) à 405 nm.

Résultats

Les résultats obtenus (exprimés en ΔOD/minute) sont consignés dans le tableau III ci-après. Ils mettent en évidence que :

30

(i) les produits EX 1 et EX 10 sont particulièrement intéressants en tant que substrats, EX 1 et EX 10 étant plus sensibles à la protéine C que le produit de référence A4, le produit EX 10 étant en outre plus sensible à la plasmine que le produit de référence A3;

(ii) le produit EX 12 est particulièrement spécifique vis-à-vis de la protéine C;

(iii) le produit EX 4 est particulièrement spécifique vis-à-vis de la plasmine;

35

(iv) le produit EX 11 est plus sensible vis-à-vis du facteur Xa que vis-à-vis de la thrombine, de la plasmine et de la protéine C; et

(v) dans la série des tripeptides, par comparaison de B1 avec C1, de B2 avec C2, de B3 avec C3, de B4 avec C4, on constate que le remplacement du groupe H de l'atome d'azote terminal du peptide par le groupe MM selon l'invention, diminue systématiquement l'activité.

40

45

50

55

60

65

TABLEAU III

PRODUIT	N° code	Vitesse d'hydrolyse en ΔOD/minute			
		Thrombine	Facteur Xa	Plasmine	Protéine C
EX 1	SQ 41	0,68	0,14	0,230	0,83
EX 2	SQ 57	0,21	0,03	0,08	0,12
EX 3	SQ 58	0,20	0,05	0,03	0,04
EX 4	SQ 59	0,05	0,13	0,64	0,16
EX 5	SQ 60	0,07	0,09	0,20	0,08
EX 6	SQ 61	0,02	0,03	0,05	0,02
EX 7	SQ 62	0,04	0,16	0,17	0,10
EX 8	SQ 63	0,04	0,16	0,21	0,11
EX 9	SQ 64	0,14	0,07	0,17	0,12
EX 10	SQ 65	0,61	0,34	1,12	0,88
EX 11	SQ 66	0,03	0,15	0,04	0,04
EX 12	SQ 67	0,18	0,07	0,14	0,41
EX 13	SQ 68	0,04	0,01	0,02	0,03
EX 14	SQ 69	0,19	0,06	0,10	0,25
EX 15	SQ 70	0,05	0,01	0,04	0,08
EX 16	SQ 73	0,24	0,03	0,07	0,08
A1	34.47	0,782	-	-	-
A2	31.39	-	1,312	-	-
A3	30.41	-	-	0,235	-
A4	65,25	-	-	-	0,520

TABLEAU III (fin)

5	B1	SQ 72	0,13	0,02	0,03	0,18
	C1	-	0,516	0,01	0,04	0,24
10	B2	SQ 71	0,14	0,01	0,04	0,09
	C2	-	0,35	0,04	0,02	0,17
15	B3	SQ 56	0,05	0,01	0,01	0,03
	C3	55.10	0,32	0,59	0,02	1,08
20	B4	SQ 52	0,01	0,01	0,04	0,02
	C4	33.08	0,61	0,02	0,65	0,11

25

Les dérivés dipeptidiques de formule I selon l'invention sont particulièrement intéressants en tant que substrats enzymatiques dans le domaine des dosages. Ils peuvent être conditionnés sous forme de kits ou trousse de dosage avec les autres réactifs requis pour lesdits dosages.

30

Revendications

- 35 1. Composé dipeptidique caractérisé en ce qu'il est choisi parmi l'ensemble comprenant :
 - (i) les composés de formule :

$$Q-A_1-A_2-R_1 \quad (I)$$
 dans laquelle :

$$Q \text{ est un reste } RO-CO-(CR_2R_3)_n-CO \text{ où}$$
- 40 R représente l'atome d'hydrogène, un groupe alkyle en C₁-C₄, un groupe phényle éventuellement substitué par un ou plusieurs groupes notamment CH₃, OCH₃ et alkylènedioxy, un groupe benzyle éventuellement substitué par un ou plusieurs groupes, notamment CH₃ OCH₃ et alkylènedioxy, ou, un groupe tosylméthoxy;
- 45 R₂ et R₃, identiques ou différents, représentent chacun l'atome d'hydrogène ou un groupe alkyle en C₁-C₄;
- 50 n est un nombre entier ayant pour valeur 1 à 5; R₁ qui est un reste amino de formule NH-R'₁ constitue un marqueur clivable du groupe A₂ par hydrolyse enzymatique, le groupe R'₁ intervenant comme support du moyen de marquage;
- 55 A₁ est un reste de monoaminoacide choisi parmi l'ensemble comprenant les restes d'aminoacides non-basiques;
- 60 A₂ et un reste de monoaminoacide choisi parmi l'ensemble comprenant les restes d'α-aminoacides basiques; et
 - (ii) leurs sels d'addition.
- 65 2. Composé dipeptidique suivant la revendication 1, caractérisé en ce que A₁ est un reste choisi parmi l'ensemble comprenant
 - 1°) les restes d'aminoacides naturels ou synthétiques qui comprennent une seule fonction acide et une seule fonction basique,
 - 2°) les restes d'aminoacides naturels ou synthétiques qui comprennent une seule fonction basique et plus d'une fonction acide et dans lesquels chaque fonction acide latérale est susceptible d'être bloquée notamment sous forme amid ou ester, et
 - 3°) les restes d'aminoacides naturels ou synthétiques qui comprennent une seule fonction acide et plus d'une fonction basique et dans lesquels chaque fonction basique latérale est convenablement substituée pour supprimer essentiellement le caractère basique,
- 70 lesdits restes sus-visés pouvant comporter des groupes hydroxyle (OH) ou thiol (SH) latéraux qui sont susceptibles d'être bloqués, le cas échéant, par un groupe protecteur éther ou ester.

2. Composé dipeptidique suivant la revendication 1, caractérisé en ce que A₁ est choisi parmi l'ensemble constitué par

a) Ala, β -Ala, Cys, Gin, Gly, 4-Hyp, 3-Hyp, Leu, Met, NLeu, NVal, Phe, Pro, Sar, Ser, Thr, Tyr et Val, où le groupe OH latéral des restes 4-Hyp, 3-Hyp, Ser, Thr et Tyr est protégé ou non par un groupe protecteur éther ou ester, et où le groupe SH latéral du reste Cys est protégé ou non par un groupe protecteur thioéther ou thioester,

b) Asp, β -Asp, Glu et γ -Glu, dans lesquels la fonction acide latérale est libre ou bloquée sous forme ester, notamment sous forme d'ester benzyllique ou t-butyllique;

c) Arg, Dab, Lys, His et Orn convenablement bloqué pour éliminer substantiellement le caractère basique,

d) ACC, Ahx, Aib, ATC, Aze, But, 4-But, CHA, CHG, CHT (où le groupe OH latéral est protégé le cas échéant sous forme éther ou ester), Cle, π -Dab, Phg, Pip et Pyr;

4. Composé dipeptidique suivant la revendication 1, caractérisé en ce que le groupe A₁ est choisi parmi l'ensemble comprenant les restes Alb, L-Ala, β -Ala, L-ATC, L-Aze, L-But, 4-But, L-CHA, L-CHG, L-CHT, Cle, Gly, L-4-Hyp, L-3-Hyp, L-Ile, L-Leu, L-NLeu, L-NVal, L-Phe, L-Pip, L-Pro, Sar, L-Ser, L-Thr, L-Tyr et L-Val, les restes L-CHT, L-4-Hyp, L-3-Hyp, L-Ser, L-Thr et L-Tyr dans lesquels le groupe OH latéral est protégé par un groupe éther ou ester, et, les restes L-Arg, L-Lys, L-His et L-Orn dans lesquels la fonction basique latérale est convenablement bloquée pour éliminer substantiellement le caractère basique.

5. Composé dipeptidique suivant la revendication 1, caractérisé en ce que A₂ est choisi parmi l'ensemble comprenant les L-Arg, L-Lys, L-His et L-Orn.

6. Composé dipeptidique suivant la revendication 1, caractérisé en ce que R est CH₃, R₂ est H, R₃ est H, et, n est 1.

7. Composé dipeptidique suivant la revendication 1, caractérisé en ce que le groupe R₁ est choisi parmi les groupes aminés NH-R'₁ qui (i) induisent une modification de coloration (ii) induisent une modification de fluorescence ou (iii) comportent au moins un élément radioactif.

8. Composé dipeptidique suivant la revendication 7, caractérisé en ce que R₁ est pNA.

9. Composé dipeptidique suivant la revendication 1, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi l'ensemble comprenant les CH₃O-CO-CH₂-CO-L-Pro-L-Arg-pNA, CH₃O-CO-CH₂-CO-L-4-Hyp-L-Arg-pNA et leurs sels d'addition.

10. Procédé de préparation d'un composé dipeptidique de formule I suivant la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend :

1°) la réaction d'un α -aminoacide N-protégé par un groupe protecteur temporaire approprié Z₁, de formule:



où A₂ est défini comme ci-dessus, avec un isocyanate, correspondant au groupe marqueur R₁, de formule :



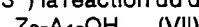
pour obtenir un composé de formule :



2°) la soumission du composé V ainsi obtenu à une réaction d'acidolyse au moyen d'un mélange HBr/AcOH pour éliminer le groupe protecteur Z₁ et obtenir le dérivé de formule :



3°) la réaction du dérivé VI ainsi obtenu avec un aminoacide N-protégé de formule :



où A₁ est défini comme indiqué ci-dessus et Z₂ est un groupe protecteur temporaire analogue à Z₁, pour obtenir par condensation un dipeptide protégé de formule :

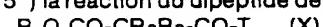


4°) la soumission dudit dipeptide N-protégé de formule VIII ainsi obtenu à une réaction d'acidolyse au moyen de l'acide trifluoroacétique pour éliminer le groupe protecteur Z₂ et donner un dipeptide de formule :



et,

5°) la réaction du dipeptide de formule IX ainsi obtenu avec un composé de formule :



où R₁, R₂ et R₃ sont définis comme indiqué ci-dessus et T représente OH, F, Cl ou Br.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

Numéro de la demande

EP 88 40 0304

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. CL.4)						
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée							
X	GB-A-2 130 221 (SQUIBB) * En entier * ---	1-4,6,9 ,10	C 07 K 5/06 C 12 Q 1/36						
D, Y	FR-A-2 471 411 (ABBOTT) * En entier * ---	1,2,7,8 ,10							
Y	CH-A- 616 912 (SANDOZ) * En entier * ---	1,2,10							
A	EP-A-0 085 255 (FUJISAWA) * En entier * ---	1							
A	EP-A-0 074 787 (SMITHKLINE BECK.) * En entier * ---	1							
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 92, 1980, page 742, résumé no. 129294c, Columbus, Ohio, US; M. BIENERT et al.: "Synthesis of substance P and of acylated partial sequences", & J. PRAKT. CHEM. 1979, 321(5), 721-40 * Résumé * ---	1,2,10							
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 83, 1975, pages 77-78, résumé no. 108713n, Columbus, Ohio, US; H. NIEDRICH et al.: "Action mechanism of peptides attacking smooth muscles. III. Effect of N-acylation upon the effectiveness of C-terminal partial sequences of eleodoisin, physalemin, and the substance P at the guinea pig ileum", & ACTA BIOL. MED. GER. 1975, 34(3), 483-9 * Résumé * ---	1							
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. CL.4)						
			C 07 K 5/00 C 12 Q 1/00						
<p>Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 33%;">Lieu de la recherche</td> <td style="width: 33%;">Date d'octroi/accord de la recherche</td> <td style="width: 33%;">Examinateur</td> </tr> <tr> <td>LA HAYE</td> <td>25-05-1988</td> <td>RAJIC M.</td> </tr> </table>				Lieu de la recherche	Date d'octroi/accord de la recherche	Examinateur	LA HAYE	25-05-1988	RAJIC M.
Lieu de la recherche	Date d'octroi/accord de la recherche	Examinateur							
LA HAYE	25-05-1988	RAJIC M.							
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>									



RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

EP 88 40 0304

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl.4)
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 82, 1975, pages 667-668, résumé no. 140521p, Columbus, Ohio, US; & DD-A-107 947 (M. BIENERT et al.) 20-08-1974 * Résumé * ---	1	
A	EP-A-0 000 330 (CIBA-GEIGY) * Page de garde; pages 31-32, 35-36, 45 * -----	1	
DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.4)			
<p>Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications</p>			
Lieu de la recherche	Date d'achèvement de la recherche	Examinateur	
LA HAYE	25-05-1988	RAJIC M.	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS			
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	

